

明細書

FRETを利用した蛍光指示薬

技術分野

本発明は、蛍光共鳴エネルギートランスファー（FRET）を利用した分子間の相互作用を分析するための蛍光指示薬、並びにその利用に関する。より詳細には、本発明は、2分子の蛍光蛋白質が標的配列を介して結合した蛍光指示薬、並びに該蛍光指示薬を用いた分子間の相互作用を分析する方法に関する。

背景技術

カメレオン（Cameleon）は、緑色蛍光蛋白質（GFP）変異体及びカルモジュリン（CaM）に基づいたCa²⁺用の遺伝子でコードされた蛍光指示薬である（Miyawaki A., 他、(1997) *Nature* 388, 882-887; 及び Tsien, R. Y. (1998) *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544）。カメレオンは、GFPの短波長変異体、カルモジュリン（CaM）、グリシルグリシンリンカー、ミオシン軽鎖キナーゼのCaM結合ペプチド（M13）、及びGFPの長波長変異体から構成されるキメラ蛋白質である。Ca²⁺がCaMに結合することにより、CaMとM13との間の分子間相互作用が開始し、これによりキメラ蛋白質は、伸長した立体構造からより小型の立体構造へと変化し、短波長変異体GFPから長波長変異体GFPへのFRETの効率が増大する。黄色カメレオン（YC）は、FRETのドナーとアクセプターとしてシアン蛍光蛋白質（CFP）と黄色蛍光蛋白質（YFP）をそれぞれ有している。黄色カメレオン（YC）は、Ca²⁺感知ドメインの組成に基づいて複数のグループに分類されている。例えば、YC2は野生型のCaMを有し、Ca²⁺に対して高い親和性を示す。一方、YC3及びYC4は、CaMドメインのCa²⁺結合ループに変異が存在するため、低親和性の指示薬である。これらのYCは、元のYFPをEYFP. 1（Miyawaki, A., 他、(1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2135-2140）で置換することによって酸性化に対する抵抗が高くなっている。

る。改変したYCとしては、YC 2. 1及びYC 3. 1が挙げられる。更に、citrine (Griesbeck, O., 他、(2001) J. Biol. Chem. 276, 29188-29194) やVenus (Nagai, T., 他、(2002) Nat. Biotechnol. 20, 87-90) のようなYFPの特に明るい変異体を用いることによって、より迅速に成熟するように作られたYCもある。上記の通り、YCは主にYFP成分を最適化することにより改良されてきた。

上述した改良にも拘わらず、YCは依然としてダイナミックレンジが低いという問題がある。YC 2. 1 2又はYC 3. 1 2などの現在入手可能な最高の変異体でも、インビトロでの Ca^{2+} 結合の際に示されるYFP/CFP比の変化はせいぜい120%である。

これらのYCは、シグナルレベルが低いので、特に細胞内小器官あるいは微小領域を標的とする場合は、シグナル/ノイズ比(S/N比)が悪化する。これらのダイナミックレンジは、YCの感知ドメインと相互作用すると考えられる内因性のCaM及びCaM結合蛋白質の存在量に応じて、インビボで減衰することが示唆されている。

発明の開示

本発明は、蛍光共鳴エネルギートランスファー(FRET)を利用した分子間相互作用又は分子内構造変化を分析するための新規な蛍光指示薬を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、高いダイナミックレンジを示す蛍光指示薬を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、指示薬のダイナミックレンジを増加させるためにアクセプターの修飾を試みた。CFPとYFPの蛍光団間の相対的方向及び距離を Ca^{2+} に依存して大きく変化させることを目的として、YCで用いるリンカーの長さや配列を最適化しても改善は僅かに過ぎないだろうと推測した。そこで、アミノ末端領域とカルボキシル末端領域とを交換し、元の末端の間を短いスペーサーで再結合した円順列変異GFP(cpCFP)を

用いるという手法を採用した (Baird, G. S., 他、(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11241-11246 ; 及び Topell, S., 他、(1999) FEBS Lett. 457, 283-289)。上記の通り、本発明者らは、酸性化に耐性を有し、かつ効率的に成熟する c p Y F P を用いすることによって、2つの発色団の遷移双極分子の相対的方向を変えることを試みた結果、優れたダイナミックレンジを示す蛍光指示薬が得られることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、分析物質の標的配列の両端にドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質が結合している構造を有し、分析物質が該標的配列に結合又は作用することにより指示薬の立体構造が変化して蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) が生じる蛍光指示薬において、上記ドナー蛍光蛋白質及び／又は上記アクセプター蛍光蛋白質が、野生型蛍光蛋白質又はその変異体蛋白質のN末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えることにより得られる円順列変異蛍光蛋白質であって、当該円順列変異を施す前の蛍光蛋白質と実質的に同一の蛍光ピーク波長を有する蛍光蛋白質であることを特徴とする蛍光指示薬が提供される。

好ましくは、蛍光蛋白質は、G F P、C F P、Y F P、R E P、B F P 又はそれらの変異体である。好ましくは、ドナー蛍光蛋白質は C F P 又はその変異体であり、アクセプター蛋白質が Y F P 又はその変異体である。

好ましくは、ドナー蛍光蛋白質及び／又は上記アクセプター蛍光蛋白質は、野生型蛍光蛋白質又はその変異体蛋白質のアミノ酸配列中の β ターンに位置するアミノ酸残基においてN末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えることにより得られる、円順列変異蛍光蛋白質である。好ましくは、前記 β ターンに位置するアミノ酸残基は、蛍光蛋白質の蛍光のダイナミックレンジが上昇するような位置のアミノ酸残基である。

好ましくは、アクセプター蛍光蛋白質は、蛍光蛋白質 Venus の円順列変異体である。好ましくは、Venus の円順列変異体は、c p 4 9 V e n u s、c p 1 5 7 V e n u s、c p 1 7 3 V e n u s、c p 1 9 5 V e n u s、又は c p 2 2

9 Venus である。

好ましくは、蛍光指示薬がさらに標的ペプチド成分とリンカー成分を含み、分析物質の標的配列が標的ペプチド成分を結合するためのペプチド結合ドメインをさらに含み、

リンカー成分が分析物質の標的配列と標的ペプチド成分とを共有的に結合し、標的配列と標的ペプチド成分がアクセプター蛍光分子成分又はドナー蛍光分子成分の何れかに共有的に結合し、

標的配列に結合した分析物質が標的ペプチド成分及びペプチド結合ドメインの相対的位置又は方向の変化を誘導し、次いでドナー分子及びアクセプター分子成分の相対的位置又は方向に変化が生じ、これにより蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) の効率に変化が生じる蛍光指示薬が提供される。

好ましくは、標的配列は、カルモジュリン、cGMP 依存性蛋白質キナーゼ、ステロイドホルモン受容体、ステロイドホルモン受容体のリガンド結合ドメイン、蛋白質キナーゼ C、イノシトール-1, 4, 5-トリホスフェート受容体、又はレコベリンであり、特に好ましくは、カルモジュリンである。

好ましくは、標的ペプチド成分は、骨格筋ミオシン軽鎖キナーゼ (skMLCKp)、平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ (smMLCK)、カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII)、カルデスモン、カルスペルミン、ホスホフルクトキナーゼ、カルシネウリン、ホスホリラーゼキナーゼ、Ca²⁺-ATP アーゼ、59 Kda ホスホジエステラーゼ (PDE)、60 Kda ホスホジエステラーゼ (PDE)、ニトリックオキシドシンターゼ、I 型アデニルシクラーゼ、Bordetella pertussis アデニルシクラーゼ、ニューロモジュリン、スペクトリン、ミリストイル化アラニンリッチ C キナーゼ基質 (MARCKS)、MacMARCKS (F52)、b-Adducin、ヒートショック蛋白質 HSP90a、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテイン 160 (HIV-1 gp160)、ブラッシュボーダーミオシン重鎖-I (BBMHBI)、希ミオシン重鎖 (MHC)、マストパラン、メリチン、グルカゴン、セクレチン、血管作動性腸ペプチド (VIP)、ガストリン阻害ペプチド (GIP)、又はカルモジュリン結合ペプチド-2 (Model ペプチド CBP2) のカルモジュリン結

合ドメインである。

好ましくは、リンカー成分は1から30アミノ酸残基のペプチド成分である。

本発明の蛍光指示薬は、好ましくは、さらに局在化配列を含む。好ましくは、局在化配列は核局在化配列、小胞体局在化配列、ペルオキシソーム局在化配列、ミトコンドリア局在化配列、ゴルジ体局在化配列、又は細胞膜局在化配列である。

特に好ましくは、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45又は配列番号46の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光指示薬が提供される。

本発明の別の側面によれば、試料中の分析物質を検出又は測定する方法であって、

- (1) 試料と本発明の蛍光指示薬とを接触させる工程；
 - (2) ドナー成分を励起させる工程；及び
 - (3) 試料中の分析物質の濃度や活性に対応した試料中の蛍光共鳴エネルギー転移の程度を測定する工程；
- を含む方法が提供される。

好ましくは、試料は生細胞であり、接触工程は蛍光指示薬を細胞中に取り込ませることを含む。好ましくは、細胞へ蛍光指示薬を取り込ませる工程は、蛍光指示薬の発現をコードする核酸配列に作動的に連結した発現調節配列を含む発現ベクターを細胞にトランスフェクションすることを含む。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛍光指示薬をコードする核酸、当該核酸を含む発現ベクター、並びに当該核酸又は発現ベクターを有する形質転換体が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、YC3.12及び新規YC変異体の構造とスペクトル特性を示す。図1のAは、元のN末端(Met1)及び新規N末端(Thr49、Gln157、Asp173、Leu195、及びIle229)を有するGFPの三次元構造を示す。図1のBは、YC3.12(配列番号41)、YC3.20(配列番号4

2)、Y C 3. 3 0 (配列番号 4 3)、Y C 3. 6 0 (配列番号 4 4)、Y C 3. 7 0 (配列番号 4 5)、及び Y C 3. 9 0 (配列番号 4 6) のドメイン構造を示す。X C a M は *Xenopus calmodulin* を示す。E 1 0 4 Q は、三番目の Ca^{2+} 結合ループの位置 1 2 における保存された二座グルタミン酸 (E 1 0 4) からグルタミンへの変異を示す。図 1 の C は、 Ca^{2+} がゼロ (点線) 及び飽和 (実線) における Y C 変異体の発光スペクトル (4 3 5 nm で励起) を示す。図 1 の D は、 Ca^{2+} がゼロ及び飽和における Y C 変異体 (Y C 3. 1 2、Y C 3. 2 0、Y C 3. 3 0、Y C 3. 6 0、Y C 3. 7 0 及び Y C 3. 9 0) の蛍光異方性を示す。図 1 の E は、p H 7. 4 における Y C 2. 6 0 (三角)、Y C 3. 6 0 (丸) 及び Y C 4. 6 0 (四角) の Ca^{2+} 滴定曲線を示す。図 1 の F は、 Ca^{2+} がゼロ及び飽和における Y C 3. 6 0 の p H 滴定曲線を示す。

図 2 は、Y C 3. 6 0 及び Y C 3. 1 2 を発現する H e L a 細胞中における Ca^{2+} 動態の比較測定を示す。図 2 の A 及び B は、Y C 3. 6 0 (A) 及び Y C 3. 1 2 (B) を用いて得た蛍光画像を示す (励起 4 9 0 nm、発光 5 3 5 nm)。目盛棒は 1 0 μm 。図 2 の C 及び D は、3 0 μM の A T P で誘導した H e L a 細胞中の Y C 3. 6 0 (C) 及び Y C 3. 1 2 (D) を用いて報告された Ca^{2+} の過渡応答を示す。上段: R_{\max} 及び R_{\min} 値 (それぞれ黒矢頭及び白矢頭で表示) についての発光比 (5 3 5 / 4 8 0 nm) の変化。下段: C F P 及び c p 1 7 3 V e n u s (C)、及び C F P 及び V e n u s (D) の蛍光強度の変化。画像取得間隔は 5 秒。

図 3 は、Y C 3. 6 0 を用いた H e L a 細胞中の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 及び $[\text{Ca}^{2+}]_{pm}$ の共焦点画像観察を示す。図 3 の A は、 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ の伝播を示す一連の共焦点疑似色比率画像を示す。これらの画像はビデオレートで取得した。図 3 の B は、H e L a 細胞の実色画像を示す。上段の細胞には、伝播速度を測定するため 6 つの R O I を設置した。目盛棒: 1 0 μm 。図 3 の C は、B で表示した 6 つの R O I 中の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ の変化の時間経過を示す。 R_{\max} 及び R_{\min} はそれぞれ黒矢頭及び白矢頭で表示する。左側の縦軸は $[\text{Ca}^{2+}]_c$ を n M で目盛付けしている。黒い水平

の棒は、Aにおいて比率画像が示されている間の時間を表示する。図3のDは、YC3.60_{pm}を発現するHeLa細胞の実色画像を示す。目盛棒：5 μm。図3のEは、Dにおいて円で表示した周辺領域中の、[Ca²⁺]_{pm}のヒスタミンに誘導された変化を示す。R_{max}及びR_{min}は、それぞれ黒矢頭及び白矢頭で表示する。左の縦軸は[Ca²⁺]_{pm}をnMで目盛付けしている。図3のFは、糸状足構造体中の[Ca²⁺]_{pm}の変化を示す一連の共焦点疑似色比率画像を示す。

発明を実施するための最良の形態

前記の通り、カメレオン (Cameleon) 及び黄色カメレオン (YC) は、生体中の神経回路の集合活動を調べる際に有用であると期待されている。元のYC及び改良したYCは、インビトロ並びに一過的に遺伝子導入した細胞試料中で明確なCa²⁺応答を示すが、これらのダイナミックレンジは、インビボではトランスジェニック動物の神経系で有意に減少する。特に、トランスジェニックマウスの脳では、信頼性のあるCa²⁺測定は成功していない。最近のYC改良体 (YC3.12) と比較すると、YC3.60は明るさは同等であるが、ダイナミックレンジは5～6倍大きい。このように、YC3.60では、S/N比が大きく向上し、従来のYCでは不可能であったCa²⁺の画像化実験が可能になった。以下の実施例でも示す通り、例えば、YC3.60をHeLa細胞の原形質膜に局在化させることにより、糸状足構造体膜下における[Ca²⁺]_cの変化を測定することができる。

cpGFPの構造を最初に報告した Baird, G. S., 他は、ドナーCFPとして Tyr145に新たなN末端を有するcpCFPを使用することにより、YCのダイナミックレンジの改良を試みた (Baird, G. S., 他, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11241-11246.)。しかし、このcpCFPでは、Ca²⁺依存性の発光比の変化は15%にまで減少した。本発明者らは、複数のcpYFPをアクセプターとして試験することにより、この手法を改良した。cp49Venus、cp157Venus、cp173Venus、cp195Venus及びcp

229 Venus を、YFP の明るい変異体である Venus から作製した。5 種の cp Venus 蛋白質は全て効率的に成熟した。本発明で作成した上記の cp Venus 蛋白質は、発色団合成の酸化反応を大幅に促進する変異である F46L を含み、N-末端が β -バレルの表面露出ループ領域に存在しているためであると考えられる。実際、cp GFP の蛍光の発生速度は、新たな N 末端及び C 末端の位置に依存する (Topell, S., 他、(1999) FEBS Lett. 457, 283-289)。C PF と YFP 間の FRET に基づいて開発された蛍光指示薬の数は増大しており (Miyawaki, A. (2003) Dev. Cell 4, 295-305)、CFP と YFP の 2 種の発色団の間の相対的距離が変えられている。このように、CFP と組み合わせて用いられる cp Venus は、各用途に対して最適化することができる。また、これを cp CFP と組み合わせて使用すると、ドナー及びアクセプター間の 2 つの遷移双極子の相対的位置の変化を更に増大させることができる。Ca²⁺ に対する cp GFP 系指示薬は数年前に開発されたものであり (Nakai, J., 他、(2001) Nat. Biotechnol. 19, 137-141 ; 及び Nagai, T, 他、(2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3197-3202)、cp GFP 自体は、FRET と相補的な非常に有用な道具になると期待される。以下、本発明の実施の形態についてさらに詳細に説明する。

本発明の蛍光指示薬は、分析物質の標的配列の両端にドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質が結合している構造を有し、分析物質が該標的配列に結合又は作用することにより指示薬の立体構造が変化して蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) が生じる蛍光指示薬であって、上記ドナー蛍光蛋白質及び／又は上記アクセプター蛍光蛋白質が、野生型蛍光蛋白質又はその変異体蛋白質の N 末端側のアミノ酸配列と C 末端側のアミノ酸配列を入れ替えることにより得られる円順列変異蛍光蛋白質であって、当該円順列変異を施す前の蛍光蛋白質と実質的に同一の蛍光ピーク波長を有する蛍光蛋白質であることを特徴とするものである。

本発明では、FRET においてドナー蛋白質及びアクセプター蛋白質として作用する蛋白質をそれぞれ 1 種ずつ使用する。即ち、本発明では、2 種類の異なる蛍光波長を有する蛍光蛋白質を使用し、これらの蛍光蛋白質の間で起きる蛍光共

鳴エネルギー転スファアーにより生じる蛍光を測定する。本発明で用いる蛍光蛋白質の種類は特に限定されるものではないが、例えば、シアン蛍光蛋白質（C F P）、黄色蛍光蛋白質（Y E P）、緑色蛋白質（G F P）、赤色蛍光蛋白質（R E P）、青色蛍光蛋白質（B F P）又はそれらの変異体などが挙げられる。

本明細書で言う、シアン蛍光蛋白質、黄色蛍光蛋白質、緑色蛋白質、赤色蛍光蛋白質、青色蛍光蛋白質又はそれらの変異体とは、各々公知の蛍光蛋白質だけでなく、それらの変異体（例えば、上記蛍光蛋白質の蛍光強度を増強した、E C F P、E Y F P、E G F P、E R F P、E B F Pなど）の全てを包含する意味である。例えば、緑色蛍光蛋白質の遺伝子は単離され配列も決定されている（Prasher, D. C. ら（1992）, “Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein”, *Gene* 111 : 229—233）。その他の蛍光蛋白質又はその変異体のアミノ酸配列も多数報告されており、例えば、Roger Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:509-44、並びにその引用文献に記載されている。緑色蛍光蛋白質（G F P）、黄色蛍光蛋白質（Y F P）またはそれらの変異体としては、例えば、オワンクラゲ（例えば、*エクオレア・ビクトリア*（*Aequorea victoria*））由来のものを使用できる。

G F P、Y F Pとそれらの変異体の一例を以下に示すが、これらに限定されるものではない。なお、F 9 9 Sという表示は、9 9 番目のアミノ酸残基がFからSに置換していることを示し、他のアミノ酸置換についても同様の表示に従って示す。

野生型G F P ;

F 9 9 S, M 1 5 3 T, V 1 6 3 Aのアミノ酸変異を有するG F P ;

S 6 5 Tのアミノ酸変異を有するG F P ;

F 6 4 L, S 6 5 Tのアミノ酸変異を有するG F P ;

S 6 5 T, S 7 2 A, N 1 4 9 K, M 1 5 3 T, I 1 6 7 Tのアミノ酸変異を有するG F P ;

S 2 0 2 F, T 2 0 3 Iのアミノ酸変異を有するG F P ;

T 2 0 3 I, S 7 2 A, Y 1 4 5 F のアミノ酸変異を有する G F P ;
S 6 5 G, S 7 2 A, T 2 0 3 F のアミノ酸変異を有する G F P (Y F P) ;
S 6 5 G, S 7 2 A, T 2 0 3 H のアミノ酸変異を有する G F P (Y F P) ;
S 6 5 G, V 6 8 L, Q 6 9 K, S 7 2 A, T 2 0 3 Y のアミノ酸変異を有する
G F P (E Y F P - V 6 8 L, Q 6 9 K) ;
S 6 5 G, S 7 2 A, T 2 0 3 Y のアミノ酸変異を有する G F P (E Y F P) ;
S 6 5 G, S 7 2 A, K 7 9 R, T 2 0 3 Y のアミノ酸変異を有する G F P (Y
F P) ;

本発明で用いる蛍光蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列は公知である。蛍光蛋白質をコードする遺伝子は市販のものを使用することもできる。例えば、クロンテック社から市販されている、E G F P ベクター、E Y F P ベクター、E C F P ベクター、E B F P ベクターなどを用いることができる。

本発明では G F P 変異体である C F P、Y F P、R F P 又はそれらの変異体を使用することが好ましく、例えば、Y F P 変異体である Venus を用いることができる。Venus については、Nagai, T. 他(2002) Nature Biotechnology 20, 87-90 を参照できる。Venus は、Y F P の 46 番目のフェニルアラニンをロイシンに置換することにより得られる蛍光蛋白質であり、従来の GFP と比較して、大腸菌内で 30~100 倍、ほ乳類の細胞内で 3~100 倍の明るさを達成し、通常の装置でも十分検出可能な蛍光を提供することができる。

本発明で利用できる他の蛍光分子としては、Vibrio fischeri 株 Y-1 由来の黄色蛍光蛋白質、Peridinin-chlorophyll (dinoflagellate Symbiodinium sp. 由来蛋白質)、Synechococcus などの海洋シアノバクテリア由来の phycobilli 蛋白質(例えば、フィコエリスリン及びフィコシアニンなど)、又はフィコエリスロビリンで再構築したオート麦由来のオートフィトクロムなどが挙げられる。これらの蛍光蛋白質は Baldwin, T. O., 他, Biochemistry 29:5509-5515 (1990), Morris, B. J., 他, Plant Molecular Biology, 24:673-677 (1994), 及び Wilbanks, S. M., 他, J. Biol. Chem. 268:1226-1235 (1993), 及び Li 他, Biochemistry

34:7923-7930 (1995)などに記載されている。

本発明で用いることができるドナー蛋白質／アクセプター蛋白質の組み合わせとしては、CFP／YFP、又はBFP／GFPなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。蛍光蛋白質が融合蛋白質をコードする遺伝子の構築は、当業者に公知の通常の遺伝子組み換え技術を用いて行うことができる。

本発明においては、ドナー蛋白質及び／又はアクセプター蛋白質として、野生型蛍光蛋白質又はその変異体蛋白質のN末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えることにより得られる円順列変異蛍光蛋白質であって、当該円順列変異を施す前の蛍光蛋白質と実質的に同一の蛍光ピーク波長を有する蛍光蛋白質を使用することを特徴とする。

即ち、円順列変異蛍光蛋白質は、N末端側からC末端側に、以下のアミノ酸配列を順番に有するものである：

- (1) 元の蛍光蛋白質のN末端からn番目のアミノ酸からC末端までのアミノ酸配列 (nは2以上の整数を示す)；
- (2) 2～20個のアミノ酸配列から成るリンカー配列；及び
- (3) 元の蛍光蛋白質のN末端の1番目からn-1番目のアミノ酸配列；

元の蛋白質に対して、上記のようにN末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えることにより蛋白質の構造を変化させることを、円順列変異(サーキュラーパーミュテーション)とも称する。本発明では、上記した各種蛍光蛋白質に円順列変異(サーキュラーパーミュテーション)を施すことによって、FRETにおいて高いダイナミックレンジを有する新規な蛍光指示薬を作製することに成功したものである。

リンカー配列のアミノ酸配列は、作製される融合蛍光蛋白質がカルシウムイオン指示薬として所望の効果を発揮する限り、特に限定されないが、側鎖が比較的小さいアミノ酸配列を主として含むことが好ましく、また親水性の側鎖を有するアミノ酸が好ましい。アミノ酸の個数は通常2～20個程度であり、好ましくは3～10個程度であり、特に好ましくは5～10個程度である。リンカー配列の

具体例としては、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly 等が挙げられるが、これらに限定されるものでもない。

円順列変異（サーキュラーパーミュテーション）を施す位置は、得られる円順列変異蛍光蛋白質が、円順列変異を施す前の蛍光蛋白質と実質的に同一の蛍光ピーク波長を有する蛍光蛋白質であれば特に限定されないが、好ましくは、元のアミノ酸配列中の β ターンに位置するアミノ酸残基においてN末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えることが好ましい。さらに、前記 β ターンに位置するアミノ酸残基は、円順列変異蛍光蛋白質の蛍光のダイナミックレンジが、円順列変異を施す前の蛍光蛋白質のダイナミックレンジより向上するような位置のアミノ酸残基であることが特に好ましい。

本発明で用いる蛍光蛋白質の具体例としては、蛍光蛋白質 Venus の円順列変異体である、本明細書の実施例で作製した cp49Venus、cp157Venus、cp173Venus、cp195Venus、又はcp229Venusなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。cp49Venus、cp157Venus、cp173Venus、cp195Venus、又はcp229Venusではそれぞれ、蛍光蛋白質 Venus のアミノ酸番号49の Thr49、アミノ酸番号157の Gln、アミノ酸番号173の173、アミノ酸番号195の Leu、及びアミノ酸番号229の Ile において、N末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えられている。

また、本発明の蛍光指示薬の具体例としては、本明細書の実施例で作製した YC3.20（配列番号42）、YC3.30（配列番号43）、YC3.60（配列番号44）、YC3.70（配列番号45）、及びYC3.90（配列番号46）が挙げられる。

本発明の蛍光指示薬の具体的な構成としては、

蛍光指示薬がさらに標的ペプチド成分とリンカー成分を含み、分析物質の標的配列が標的ペプチド成分を結合するためのペプチド結合ドメインをさらに含み、リンカー成分が分析物質の標的配列と標的ペプチド成分とを共有的に結合し、

標的配列と標的ペプチド成分がアクセプター蛍光分子成分又はドナー蛍光分子成分の何れかに共有的に結合し、

標的配列に結合した分析物質が標的ペプチド成分及びペプチド結合ドメインの相対的位置又は方向の変化を誘導し、次いでドナー分子及びアクセプター分子成分の相対的位置又は方向に変化が生じ、これにより蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) の効率に変化が生じるような蛍光指示薬を作製することができる。

本発明では、標的配列として Ca^{2+} によって構造変化を起こすドメインの N 末端と C 末端に蛍光分子を結合させたものを作製し、蛍光指示薬を作製した。このような蛍光指示薬を用いることにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化をモニターすることが可能になる。

「共有的に結合」とは、共有結合又は 2 分子間の他の共有的連結を意味する。共有的な連結としては、2 分子を連結する二価成分が挙げられる。

「標的配列」とは、分析物質と結合できるアミノ酸配列を意味する。好ましい標的配列は、分析物質と結合すると立体構造が変化する。

「標的ペプチド」は標的配列と結合できるペプチドを意味する。標的ペプチドは、標的配列と結合するペプチドの部分配列である。

「分析物質」は、標的配列に結合する溶液中の分子又はイオンを意味し、標的配列の立体構造を変化させるものである。分析物質は標的配列に可逆的に結合しても非可逆的に結合してもよい。

蛍光分子成分は標的配列成分のアミノ末端及びカルボキシ末端に共有的に結合していることが好ましい。これにより、ドナー蛍光分子成分及びアクセプター蛍光分子成分は、分析物質が結合した際に互いに密接に移動できる。あるいは、ドナー及びアクセプター成分は、分析物質の結合の際に互いに離れるように移動してもよい。一例としては、アクセプター成分は、標的配列成分に結合している標的ペプチド成分に共有的に結合し、標的ペプチド成分はリンカー成分を介して標的配列成分に共有的に結合している。リンカー成分はフレキシブルなもので、標的ペプチド成分が標的配列成分に結合することができる。ドナー成分は、ドナー

成分の励起スペクトル内の適当な強さの光によって励起される。ドナー成分は吸収したエネルギーを蛍光として放出する。アクセプター蛍光分子成分が励起状態のドナー成分を消光できる位置に存在する場合、蛍光エネルギーはアクセプター成分に転移されて、蛍光が放出される。

ドナー及びアクセプター蛍光分子成分間の FRET の効率は、2つの蛍光分子が相互作用する能力を調節することによって調節することができる。標的配列成分、標的ペプチド成分及びリンカー成分の性質も FRET 及び分析物質に対する指示薬の応答に影響する。通常、大きな立体構造変化が標的配列成分に生じることが望ましい。

標的配列成分は、分析物質の結合に際して立体構造が変化する蛋白質又はその一部である。そのような蛋白質の例としては、カルモジュリン(CaM)、cGMP-依存性蛋白質キナーゼ、ステロイドホルモン受容体（又はそのリガンド結合ドメイン）、プロテインキナーゼ C、イノシトール-1,4,5-トリホスフェート受容体、又はレコベリンなどが挙げられる（例えば、Katzenellenbogen, J. A. & Katzenellenbogen, B. S. *Chemistry & Biology* 3:529-536 (1996), 及び Ames, J. B., 他, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:432-438 (1996) を参照）。標的配列成分は好ましくは、分析物質以外に標的ペプチドにも結合する。

標的ペプチド成分は以下の表 1 に記載の任意のアミノ酸配列またはその一部を含むことができる。但し、標的ペプチドは標的配列成分に結合できなくてはならない。標的ペプチドは、カルモジュリン結合ドメインの部分配列でもよい。表 1 に挙げた標的ペプチド成分は標的配列成分 CaM によって認識される（例えば、Crivici, A. & Ikura, M. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:84-116 (1995) を参照）。標的ペプチド成分を改変して、分析物質に対する蛍光指示薬の応答を増強してもよい。他の標的配列に対する他の標的ペプチド成分も当業者には既知である。

表 1

標的	配列
SkMLCK (M13)	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL (配列番号 1)
smMLCK (smMLCKp)	ARRKWQKTGHAVRAIGRLSS (配列番号 2)
CaMKII	ARRKLKGAILTTMLATRNFS (配列番号 3)
Caldesmon	GVRNIKSMWEKGNVFSS (配列番号 4)
Calspermin	ARRKLKAAVKAVVASSRLGS (配列番号 5)
PFK (M11)	FMNNWEVYKLLAHIRPPAPKSGSYTV (配列番号 6)
Calcineurin	ARKEVIRNKIRAIGKMARVFSVLR (配列番号 7)
PhK (PhK5)	LRRLIDAYAFRIYGHVVKKGQQQNRG (配列番号 8)
(PhK13)	RGKFKVICLTVLASVRIYYQYRRVKPG (配列番号 9)
Ca ²⁺ -ATPase (C28W)	LRRGQILWFRGLNRIQTQIKVVNAFSSS (配列番号 10)
59-kDa PDE	RRKHLQRPIFRLRCLVKQLEK (配列番号 11)
60-kDa PDE	TEKMWQRLKGILRCLVKQLEK (配列番号 12)
NOS (NO-30)	KRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ (配列番号 13)
Type I AC (AC-28)	IKPAKRMKFKTVCYLLVQLMHCRCMFKA (配列番号 14)
Borderella periussis	AC IDLLWKIARAGARSavgTEA (配列番号 15)
Neuromodulin	KAHKAATKIQASFRGHITRKKLKGEKK (配列番号 16)
Spectrin	KTASPWKSARLMVHTVATFNSIKE (配列番号 17)
MARCKS	KKKKKRFsFKKSFKLSGFSFKKSKK (配列番号 18)
F52 or MacMARKS	KKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNRK (配列番号 19)
β -Adducin	KQQKEKTRWLNTPNTYLVRVNADEVQRNMGS (配列番号 20)
HSP90a	KDQVANSAFQERLRKHGLEVI (配列番号 21)
HIV-1 gp160	YHRLRDLILLIVKRIVELLGRR (配列番号 22)
BBMHBI	QQLATLIQKTYRGWRCRTHYQLM (配列番号 23)
Dilute MHC	RAACIRIQKTIRGWLLRKRYLCMQ (配列番号 24)
Mastoparan	INLKAALAKKIL (配列番号 25)
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (配列番号 26)
Glucagon	HSQGTFTTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (配列番号 27)
Secretin	HSDGTFTSELSRLRDSARLQRLQLGLV (配列番号 28)
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILN (配列番号 29)
GIP	YADGTFISDYSAIMNKIRQQDFVNWLLAQQQKS (配列番号 30)
Model ペプチド CBP2	KLWKLLKLLKLLKLG (配列番号 31)

略号の説明

AC, アデニルシクラーゼ;

BBMHCI, brush-border ミオシン重鎖-I;

CaMKII, カルモジュリンキナーゼ II;

CBP2, カルモジュリン結合ペプチド-2;

GIP, ガストリン阻害ペプチド;

HIV-1 gp160, ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖蛋白質 160;

HSP, ヒートショック蛋白質;

MARCKS, ミリスチル化アラニンリッチ C キナーゼ基質;

MHC, ミオシン重鎖;

NOS, ニトリックオキシドシンターゼ;

PDE, ホスホジエステラーゼ;

PFK, ホスホフルクトキナーゼ

PhK, ホスホリラーゼキナーゼ;

sk-, smMLCK, 骨格筋及び平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ;

VIP, 血管作動性腸ペプチド

リンカー成分の長さは、FRET 及び、分析物質の結合により立体構造変化の速度及び特異性を最適化するように選択する。リンカー成分は、標的配列成分と標的ペプチド成分とが自由に相互作用して分析物質濃度に応答できるような長さと柔軟さを有することが好ましい。FRET 効果を最適化するために、ドナー及びアクセプター蛍光分子成分の平均距離は、好ましくは約 1 nm から約 10 nm であり、より好ましくは約 1 nm から約 6 nm であり、特に好ましくは 1 nm から約 4 nm である。リンカー分子が短すぎたり堅固すぎると、ドナー及びアクセプター分子成分は容易に位置を変えることができない。リンカー成分が長すぎると、標的ペプチド成分は効率的に標的配列成分に結合できない。リンカー成分は好ましくはペプチド成分である。好ましいリンカー成分は、1～30 アミノ酸残基、好ましくは

1～15アミノ酸残基のペプチドである。リンカーの一例は、-Gly-Gly- リンカーである。

リンカー成分はフレキシブルなスペーサーアミノ酸配列を含んでもよい。リンカー成分については、例えば、Huston, J. S., 他, PNAS 85:5879-5883 (1988), Whitlow, M., 他, Protein Engineering 6:989-995 (1993), 及び Newton, D. L., 他, Biochemistry. 35:545-553 (1996)などに記載されている。

標的配列は、分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させるものであればよく、例えば、酵素によって認識されて切断される配列でもよい。例えば、標的配列としてプロテアーゼの基質部位を使用することができる。プロテアーゼとしてカススペース3を用いる場合は、標的配列のアミノ酸配列として DEVDを使用することができる。

蛍光指示薬には局在化配列が含まれていてもよい。局在化配列により、指示薬は、好適な細胞内小器官標的シグナル又は局在化宿主蛋白質と融合することにより細胞内の特定の部位に運ばれる。局在化配列又はシグナル配列をコードするポリヌクレオチドを蛍光指示薬をコードするポリヌクレオチドの5'末端に連結又は融合することができ、これによりシグナルペプチドは生じる融合ポリヌクレオチド又はポリペプチドのアミノ末端に位置することができる。

真核細胞の場合、シグナルペプチドは融合ポリペプチドを小胞体を経由して輸送する機能を有すると考えられている。分泌蛋白質は次いでゴルジ体に運ばれ、分泌小胞及び細胞外空間、そして好ましくは外部環境に運ばれる。本発明で利用できるシグナルペプチドは、蛋白質分解酵素認識部位を含むプレプロペプチドでもよい。

局在化配列は核局在化配列、小胞体局在化配列、ペルオキシソーム局在化配列、ミトコンドリア局在化配列、又は局在化蛋白質でもよい。局在化配列は、例えば、"Protein Targeting", 35章、Stryer, L., Biochemistry (4th ed.). W. H. Freeman, 1995に記載されている標的配列でもよい。局在化配列は、局在化蛋白質でもよい。局在化配列の具体例としては、核を標的とする配列(KKKRK) (配列番号32)、ミ

トコンドリアを標的とする配列(アミノ末端が MLRTSSLFTRRVQPSLFRNILRLQST-) (配列番号 3 3)、小胞体を標的とする配列(KDEL (配列番号 3 4)、C-末端に) (シグナル配列は N 末端に存在する)、ペルオキシソームを標的とする配列(SKL (配列番号 3 5)、C-末端に)、細胞膜へのプレニレーション又は挿入を標的とする配列 ([CaaX] CAAX (配列番号 3 6), CC (配列番号 3 7), CXC (配列番号 3 8), 又は CCXX (配列番号 3 9)、C-末端に)、細胞膜の細胞質側を標的とする配列(SNAP-25 への融合)、又はゴルジ体を標的とする配列(furin への融合)などが挙げられる。

蛍光指示薬は組み換え DNA 技術により融合蛋白質として製造できる。蛍光蛋白質の組み換え生産は、蛋白質をコードする核酸の発現により行う。蛍光蛋白質をコードする核酸は、当業者に既知の方法で入手できる。例えば、蛋白質をコードする核酸は、オワンクラゲ緑色蛍光蛋白質の DNA 配列に基づいたプライマーを用いてオワンクラゲ由来 cDNA の PCR によって単離することができる。蛍光蛋白質の各種変異体は、蛍光蛋白質をコードする核酸の部位特異的変異誘発又はランダム変異誘発によって作製することができる。ランダム変異誘発は、0.1 mM MnCl を用いたりヌクレオチド濃度のバランスを崩して PCR を行うことにより行うことができる。

発現ベクターの構築及びトランスフェクションした細胞での遺伝子の発現は、当業者に公知の分子クローニング手法に従って行うことができる。これらの詳細は、Sambrook 他, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989)、並びに Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel 他, eds., (Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., most recent Supplement)に記載されている。

ポリペプチドの発現をコードする配列で細胞をトランスフェクションするために使用する核酸は一般に、ポリペプチドの発現をコードするヌクレオチド配列に作動的に連結した発現調節配列を含む発現ベクターである。ここで言う“ポリペプチドの発現をコードするヌクレオチド配列”とは、mRNA の転写及び翻訳により、

ポリペプチドを産生する配列を言う。例えば、イントロンを含む配列もこれに含まれる。ここで言う“発現調節配列”とは、それが作動的に連結している核酸の発現を調節する核酸配列を言う。発現調節配列が核酸配列の転写及び翻訳を調節および制御する際に、発現調節配列は核酸配列に作動的に連結している。発現調節配列は、好適なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、蛋白質コード遺伝子の前の開始コドン（即ち、ATG）、イントロンのスプライシングシグナル、及び停止コドンなどを含むことができる。

当業者に周知の方法を使用して、蛍光指示薬のコード配列と、適当な転写・翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、インビトロ組み換えDNA技術、合成技術、インビボ組み換え・遺伝組み換えなどが挙げられる（例えば、Maniatis, 他, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989 に記載の技術を参照）。組み換えDNAによる宿主細胞の形質転換は当業者に周知の慣用技術によって行うことができる。宿主細胞が大腸菌などの原核細胞である場合、DNAを取り込むことができるコンピテント細胞は、対数増殖期後に回収し、当業者に周知のCaCl₂法で処理した細胞を用いて作製することができる。あるいは、MgCl₂又はRbClを使用することもできる。形質転換は、宿主細胞のプロトプラストを作成後、またはエレクトロポレーションにより行うことができる。

宿主細胞が真核細胞である場合、リン酸カルシウム共沈殿法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リボソーム又はウイルスベクターに封入したプラスミドの挿入などのDNAトランスフェクション法を使用することができる。真核細胞は、本発明の融合ポリペプチドをコードするDNA配列と、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子などの適当な表現型をコードする外来DNA分子とを一緒にトランスフェクションすることができる。サルウイルス40（SV40）又はウシパピローマウイルスなどの真核ウイルスベクターを使用して、真核細胞を一過的に感染または形質転換して蛋白質を発現させることもできる（Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982

を参照)。好ましくは、真核細胞宿主を宿主細胞として使用する。

微生物又は真核細胞で発現させた本発明のポリペプチドの単離及び精製方法は任意の慣用方法を使用することができ、例えば、プレパラティブクロマトグラフィー分離及び免疫学的分離（モノクローナル又はポリクローナル抗体又は抗原を使用することを含むものなど）などが挙げられる。

蛍光指示薬をコードする配列を発現させるために、各種の宿主／発現ベクター系を使用することができる。例えば、蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、又はコスミド DNA 発現ベクターで形質転換した細菌；蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母；蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）を感染させた植物細胞、又は蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ti プラスミド）で形質転換した植物細胞；蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；あるいは、蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス）を感染させた動物細胞系などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

使用する宿主／ベクター系に応じて、適当な転写及び翻訳要素（例えば、構成的又は誘導性プロモーター、転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなど）を発現ベクター中で使用することができる（例えば、Bitter, 他, *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987 を参照）。例えば、細菌系にクローニングする場合、バクテリオファージ λ 、*plac*、*ptrp*、*ptac* (*ptrp-lac* ハイブリッドプロモーター) の *pL* などの誘導性プロモーターを使用することができる。哺乳動物細胞系にクローニングする場合、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、レトロウイルスロングターミナルリピート；アデノウイルス後期

プロモーター；ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーターなど）を使用することができる。組み換え DNA 又は合成技術で作製したプロモーターを使用して蛍光指示薬をコードする挿入配列を転写させることもできる。

細菌系では、発現する蛍光指示薬の意図する用途に応じて多数の発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、大量の蛍光指示薬を産生させる場合には、容易に精製される融合蛋白質産物の高量の発現を指令するベクターが望ましい。蛍光指示薬の回収を助ける切断部位を含むように加工したものが好ましい。

酵母では、構成的又は誘導性のプロモーターを含む多数のベクターを使用することができる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel, 他, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13, 1988; Grant, 他., Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp. 516-544, 1987; Glover, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3, 1986; 並びに、Bitter, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684, 1987; 及び The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Eds. Strathern 他., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II, 1982 などを参照することができる。ADH 又は LEU2 などの構成的酵母プロモーターあるいは GAL などの誘導性プロモーターを使用することができる (Cloning in Yeast, Ch. 3, R. Rothstein In: DNA Cloning Vol. 11, A Practical Approach, Ed. DM Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986)。あるいは、酵母の染色体への外来 DNA の組み込みを促進するベクターを使用することもできる。

植物の発現ベクターを使用する場合、蛍光指示薬をコードする配列の発現は、プロモーターにより促進することができる。例えば、CaMV の 35S RNA 及び 19S RNA プロモーターなどの ウイルスプロモーター (Brisson, 他, Nature 310:511-514, 1984)、又は TMV に対するコート蛋白質プロモーター (Takamatsu, 他, EMBO J. 6:307-311, 1987) を使用できる。あるいは、RUBISCO の小型サブユニット (Coruzzi,

他, 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, 他, Science 224:838-843, 1984)などの植物プロモーター、又はヒートショックプロモーター（例えば、大豆 hsp17.5-E 又は hsp17.3-B (Gurley, 他, Mol. Cell. Biol. 6:559-565, 1986)など）を使用してもよい。これらの構築物は、Ti プラスミド、Ri プラスミド、植物ウイルスベクター、直接 DNA 形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどによって植物に導入することができる。これらの技術については、例えば、Weissbach & Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463, 1988; 及び Grierson & Corey, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9, 1988 などに記載されている。

昆虫系を使用して蛍光指示薬を発現することも可能である。例えば、オートグラフアカリフォルニア核多角体病ウイルス (AcNPV) をベクターとして使用して外来遺伝子を発現することができる。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞で生育する。蛍光指示薬をコードする配列をこのウイルスの非本質領域（例えば、多角体病遺伝子）中にクローニングし、AcNPV プロモーターの制御下に置く。蛍光指示薬をコードする配列を正しく挿入した場合、多角体病遺伝子是不活化し、未閉塞の組み換えウイルスが産生する。これらの組み換えウイルスを使用して *Spodoptera frugiperda* 細胞に感染させ、その細胞内で挿入した遺伝子を発現させることができる（例えば、Smith, 他, J. Virol. 46:584, 1983; 及び米国特許第 4,215,051 号を参照）。

真核細胞系、好ましくは哺乳動物細胞の発現系を使用することにより、発現した哺乳動物の蛋白質の適切な翻訳後修飾を行うことが可能になる。一次転写物の適切なプロセッシング、グリコシル化、リン酸化、及び遺伝子産物の分泌のための細胞機構を有する真核細胞を、蛍光指示薬の発現のための宿主細胞として使用することが好ましい。そのような宿主細胞株としては、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、Jurkat、HEK-293、並びに WI38 などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

組み換えウイルス又はウイルス要素を利用して発現を指令する哺乳動物細胞系を構築することができる。例えば、アデノウイルス発現ベクターを使用する場合、蛍光指示薬をコードする配列をアデノウイルス転写／翻訳調節複合体（例えば、後期プロモーター及び3つのリーダー配列など）に連結することができる。このキメラ遺伝子をインビトロ又はインビボ組み換えによりアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非本質領域（例えば、E1 又は E3 領域）への挿入により感染宿主で生存可能で蛍光指示薬を発現することができる組み換えウイルスが得られる（例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3655-3659, 1984 を参照）。あるいは、ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーターを使用することができる（例えば、Mackett, 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 7415-7419, 1982; Mackett, 他, J. Virol. 49: 857-864, 1984; Panicali, 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4927-4931, 1982 を参照）。染色体外要素として複製する能力を有するウシパピローマウイルスに基づくベクターを使用することも可能である（Sarver, 他, Mol. Cell. Biol. 1: 486, 1981）。この DNA をマウス細胞に導入した直後に、プラスミドは細胞当たり約 100～200 コピー複製する。挿入した cDNA の転写には、プラスミドが宿主の染色体に組み込まれることは必要ではなく、これにより高レベルの発現が生み出される。これらのベクターは、neo 遺伝子などの選択マーカーをプラスミド中に含めることによって安定した発現のために使用することができる。あるいは、レトロウイルスゲノムを改変して、宿主細胞内での蛍光指示薬遺伝子の発現を誘導及び指令することができるベクターとして使用することができる（Cone & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6349-6353, 1984）。高レベルの発現は、メタロチオニン IIA プロモーター及びヒートショックプロモーターなどの誘導性プロモーターを使用することによって達成することができる。

組み換え蛋白質の長期間の高収量の生産のためには、安定な発現が好ましい。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用する代わりに、宿主細胞は、適当な発現調節要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネー

ター、ポリアデニレーション部位など) および選択マーカーで調節された蛍光指示薬 cDNA で形質転換することができる。組み換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、細胞が染色体にプラスミドを安定に組み込み、成長してコロニーを形成し、これをクローニングして細胞株として樹立することができる。例えば、外来 DNA の導入後、組み換え細胞を富裕培地で 1 ～ 2 日間増殖させ、その後に選択培地に切り替えることができる。多数の選択系を使用することができるが、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (Wigler, 他, Cell, 11: 223, 1977)、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026, 1962)、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy, 他, Cell, 22: 817, 1980) 遺伝子をそれぞれ、tk⁻, hgp⁺rt⁻ 又は ap⁺rt 細胞で使うことができる。また、代謝拮抗物質耐性を、メソトレキセートに対する耐性を付与する dhfr (Wigler, 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567, 1980; O'Hare, 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8: 1527, 1981)、ミコフェノール酸に対する耐性を付与する gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072, 1981)、アミノグルコシド G-418 に対する耐性を付与する neo (Colberre-Garapin, 他, J. Mol. Biol., 150:1, 1981)、及びハイグロマイシンに対する耐性を付与する hyg⁺ro (Santerre, 他, Gene, 30: 147, 1984) 遺伝子の選択の基礎として使うことができる。

近年、さらに別の選択遺伝子が報告されている。例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを使うことを可能にする trpB、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを使うことを可能にする hisD (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8047, 1988)、並びに、オルニチンデカルボキシラーゼインヒビターである 2- (ジフルオロメチル) -DL-オルニチンに対する耐性を付与する ODC (ornithine decarboxylase) (McConlogue L., In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, ed., 1987) などが挙げられる。

本発明の蛍光指示薬ポリペプチドをコードする DNA 配列は、適当な宿主細胞

にDNA導入することによりインビトロで発現することができる。即ち、本発明の組み換え蛍光蛋白質は、大腸菌などの原核細胞、又は酵母や哺乳動物細胞などの真核細胞において核酸を発現することによって作製することができる。

構築物は、蛍光指示薬の単離を簡単にするためのタグを含んでいてもよい。例えば、6個のヒスチジン残基からなるポリヒスチジンタグを蛍光蛋白質のアミノ末端に付加することができる。ポリヒスチジンタグにより、ニッケルキレートクロマトグラフィーにより一回の操作で蛋白質を簡単に単離することが可能になる。

好ましくは、本発明の蛍光指示薬は、組み換えDNA技術で作製した融合蛋白質である。ここで、シングルポリペプチドは、ドナー成分、ペプチドリンカー成分及びアクセプター成分を含む。ドナー成分は、ポリペプチド中のアクセプター成分に対してアミノ末端側に位置することができる。そのような融合蛋白質は通常以下のような構造を有する：(アミノ末端) ドナー蛍光蛋白質—ペプチドリンカー成分—アクセプター蛍光蛋白質 (カルボキシ末端)。あるいは、ドナー成分は、融合蛋白質中のアクセプター成分に対してカルボキシ末端に位置してもよい。そのような融合蛋白質は通常以下の構造を有する：(アミノ末端) アクセプター蛍光蛋白質—ペプチドリンカー成分—ドナー蛍光蛋白質 (カルボキシ末端)。さらに、アミノ末端及び／又はカルボキシ末端に付加的なアミノ酸配列（例えば、ポリヒスチジンタグなど）を含む融合蛋白質も本発明に包含される。

組み換え核酸によってコードされる蛍光指示薬は、ドナー蛍光蛋白質、アクセプター蛍光蛋白質及びペプチドリンカー成分の発現をコードする配列を含む。各構成要素は、融合蛋白質への発現により、ドナー成分が励起する際にドナー及びアクセプター成分がFRETを示すように選択される。組み換え核酸は、組み換え核酸に作動的に連結した発現調節配列を含む発現ベクター内に組み込むことができる。発現ベクターは、適当なプロモーター、複製配列、マーカーなどを含むことによって原核細胞または真核細胞で機能するように構成することができる。

発現ベクターは、組み換え核酸の発現のために宿主細胞にトランスフェクションすることができる。宿主細胞は、蛍光指示薬融合蛋白質を精製するために高レ

ベルの発現のために選択することができる。大腸菌 (*E. coli*) はこの目的に有用である。あるいは、宿主細胞は、その他の原核細胞でも真核細胞でもよい。細胞は培養細胞でもインビボの細胞でもよい。以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

A. 方法

(1) 遺伝子の構築

cpVenus 変異体の 5' 領域の cDNA を、*Bam*HI 部位を含有するセンスプライマー及び天然の N- 及び C- 末端の間にリンカー (GGSGG) をコードする配列を含むリバープライマーを用いて、PCR により増幅した。PCR により、これらの 3' 領域の cDNA は、リンカーをコードする配列により 5' 末端を、*Eco*RI 部位を含む配列により 3' 末端を、PCR により伸長した。*cpVenus* 変異体の完全な cDNA は、*Bam*HI 及び *Eco*RI 含有プライマーを有する 2 種の PCR 産物の混合物を用いて増幅した。制限処理された産物を、pRSET_B (Invitrogen) の *Bam*HI / *Eco*RI 部位にインフレームでクローニングし、*cp49Venus*、*cp157Venus*、*cp173Venus*、*cp195Venus*、及び *cp229Venus* を作製した。次いで、*cp49Venus*、*cp157Venus*、*cp173Venus*、*cp195Venus* 又は *cp229Venus* の cDNA の 5' 末端を PCR により修飾して、*Sac*I 部位を導入した。*Sac*I 認識部位によりコードされるこの N- 末端 EL (Glu-Leu) 配列の後ろには、5 種の変異体において、Met 残基、次いでそれぞれ Thr 49、Gln 157、Asp 173、Leu 195 及び Ile 229 が続いている。*Sac*I / *Eco*RI 断片を YC3. 12 / pRSET_B 中の *Venus* をコードしている遺伝子と置換して、それぞれ YC3. 20、YC3. 30、YC3. 60、YC3. 70、及び YC3. 90 を作製した。YC2. 60 及び YC4. 60 は、CaM ドメインを交換することによ

り、YC3.60から作製した。哺乳動物での発現のため、YC3.12及びYC3.60のcDNAをpcDNA3 (Invitrogen) にサブクローニングした。YC3.60を原形質膜下に局在させるため、K α -RasのCAAXボックスを、リンカー配列 (GTGGSGGGTGGSGGGT) (配列番号40) を介してYC3.60のカルボキシル末端に融合させた。

(2) 蛋白質発現、インビトロ分光法、Ca²⁺及びpH滴定

N-末端にポリヒスチジンタグを持つ組み換えYC蛋白質を、既報の通り (Miyawaki A., 他、(1997) *Nature* 388, 882-887)、室温で *Escherichia coli* [JM109(DE3)] に発現させ、精製し、分光学的に同定した。BECON (Takara) を用いて、440DF20 励起フィルター及び 535DF25 発光フィルターを使用して、定常状態の蛍光分極を測定した。Ca²⁺滴定は、0.09 ビス(2-アミノエチル)エチレンジグリコール-N,N,N',N' 四酢酸 (EGTA)、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N,N,N',N' 三酢酸 (EDTA-OH) 又はニトリロ三酢酸 (NTA) を用いて調製したCa²⁺フリー及びCa²⁺飽和の緩衝液の相互希釈により実施した。pH滴定は、既報の通り (Nagai, T, 他、(2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3197-3202)、pH 5.8 ~ 8.4 で調製した一連の緩衝液を用いて行った。

(3) 細胞培養及びトランスフェクション

HeLa細胞は、10%の熱不活化ウシ胎児血清を含有する Dulbecco の改変 Eagle 培地で増殖させた。細胞に、Superfect (QIAGEN) を用いてYC3.60又はYC3.12をコードする発現ベクターをトランスフェクションした。

(4) 画像化

トランスフェクション後2~4日間、Hankの平衡塩溶液緩衝液 (GIBCO) 中のHeLa細胞を画像化した。UApo40x, 1.35NA 油浸対物レンズを用いたIX-70倒立顕微鏡 (オリンパス) 上で、広視野蛍光観察を行った。YCによる二重発光

画像化は、440DF20励起フィルター、455DRLPダイクロイックミラー及び、2個の発光フィルター（CFPに対して480DF30、YFPに対して535DF25）を、フィルター交換装置(Lambda 10-2, Sutter instruments)を用いて交互に使用して行なった。干渉フィルターはOmega Optical から入手した。YCからの蛍光発光を、冷却CCDカメラ(Cool SNAP fx, Roper Scientific)を用いて画像化した。画像の取得及び解析はMetamorph/Metafluor5.0ソフトウェア(Universal Imaging)を用いて行なった。共焦点FRETビデオ画像は、PlanApo 60x, 1.4NA 油浸対物レンズを備えたIX-71(オリンパス)、回転円盤型共焦点装置(CSU21, 横河)、ダイオードポンプ固体レーザー(430nm、日立)、及び3CCDカラーカメラ(ORCA-3CCD、浜松ホトニクス)を用いて取得した。画像の取得と解析はAquacosmos 2.5 ソフトウェア(浜松ホトニクス)を用いて行なった。

B. 結果

(1) YC3.12及び新規YC変異体の構造とスペクトル特性 (図1)

野生型のN末端及びC末端を結合するためのGGSGGペプタペプチドリンカーを用いて、Venusに対して円順列変異を行なった。新末端は、 β -バレルの表面に露出したループ領域に導入した。cp49Venus、cp157Venus、cp173Venus、cp195Venus、及びcp229Venusは、それぞれThr49、Gln157、Asp173、Leu195及びIle229の新たなN末端を有する。細菌及び哺乳類培養細胞で発現した場合、これらの蛋白質は、効率的に成熟し、酸性化に対する耐性は親蛋白質Venusと同程度であった。Met1、Thr49、Gln153、Asp173、Leu195及びIle229は β -バレルの異なる部位に存在するので、Venusに加えてこれらのcpVenus蛋白質を使用することにより、YC複合体中でYFPの相対的な空間方向に顕著な変化をもたらすことができる。特に、Thr49及びAsp173は、他の残基から β -バレルの他端に移動している (図1A)。

親YCとしては、単相性のCa²⁺感度のために、YC3.12 (Nagai, T., 他、(2002) Nat. Biotechnol. 20, 87-90) を初めに使用した。これは、CaMの三番目のCa²⁺結合部位中に保存されたグルタミン酸 (E104) の変異を有し、YC3グループに属する。YC3.12中のVenusを、cp49Venus、cp157Venus、cp173Venus、cp195Venus及びcp229Venusで置換して、YC3.20、YC3.30、YC3.60、YC3.70及びYC3.90を作製した (図1B)。これらの新規YCは全て、YC3.12と同様に、細菌中で効率的に発現し、フォールディングする。次に、インビトロ実験でこれらのCa²⁺感度を試験した。意外にも、YC3.60では、Ca²⁺が0と飽和濃度の間でCFPに対するYFPの放射比が数倍増加し、YC3.30、YC3.70及びYC3.90ではYC3.12と同様のダイナミックレンジを示した。YC3.20はCa²⁺に僅かな応答のみを示した (図1C)。Venusの代わりにcp173Venusに置換すると、一般的にはCFPからのFRETに好適であったが、この効果は、複合体のCa²⁺欠乏型 (R_{min}: 0.87 (YC3.12) 対1.4 (YC3.60)) の場合よりも複合体のCa²⁺飽和型 (R_{max}: 1.8 (YC3.12) 対9.3 (YC3.60)) の場合の方が顕著であった (表2A)。CFPとYFPの発色団の間の相対角度を試験するために、CFPの440nmにおける励起と、YFPの535nmにおける発光により、定常状態の偏光度 (異方性) を測定した。Ca²⁺依存性の異方性の減少は、CFPに対するYFPの発光比の増加と相関していた (図1D)。

YC3.60の発光比 (535/480) は、見掛けの解離定数 (K'_d) が0.25 μM、Hill定数 (n) が1.7と共に単相性のCa²⁺依存性を示した (図1E、丸)。YC3.60のCa²⁺親和性を変化させるために、変異型CaMを野生型CaM又は一番目のCa²⁺結合ループに変異を含有するCaM (E31Q) の何れかで置換した (Miyawaki A., 他、(1997) Nature 388, 882-887)。得られたYCは、YC2及びYC4グループに属し、それぞれYC2.60及びYC4.60と称する。YC2.60はほぼ単相性の応答を示した (K'_d, 4

0 nM; n, 2.4)。0.2~0.3 μ Mにおいて、滴定曲線に小さな窪みがあり (図1 E、三角)、元のCaM-M13ハイブリッド蛋白質の二相性のCa²⁺感度が連想させる (Miyawaki A., 他、(1997) *Nature* 388, 882-887; 及び Porumb, T., 他、(1994) *Protein Eng.* 7, 109-115)。既報の通り (Miyawaki A., 他、(1997) *Nature* 388, 882-887; 及び Porumb, T., 他、(1994) *Protein Eng.* 7, 109-115)、YC4.60中のE31Qは、明白な二相性の応答 (K'_d , 58 nM; n, 1.7; K'_d , 14.4 μ M; n, 0.87) と共に著しく低いCa²⁺親和性を示した (図1 E、四角)。YC3.60で達成された高いダイナミックレンジ (570%) はYC2.60で維持されたが、YC4.60 (ダイナミックレンジ、360%) においては若干減衰した。YC4.60の高親和性成分及び低親和性成分は、応答の41%及び59%に寄与していた。cpVenus蛋白質は、EYFP-V68L/Q69K (EYFP. 1) 又はVenusと同様の酸感度 (pK_a = 6.0) を示したので、YC3.60は、YC3.1及びYC3.12と同じpH耐性であることが期待された。図1 FのpH滴定曲線は、生理的なpH範囲 (6.5~8.2) においてCa²⁺の存在下及び非存在下においてYFP/CFP比が有意に変化しないことを示している。しかし、YC3.1及びYC3.12と比較すると、YC3.60はpH変化によってノイズを圧倒する大きなCa²⁺依存性応答を示し、S/N比が著しく向上する。YCの変異体の特性を表2 A及び2 Bに示す。表2のAは、従来のYC変異体及び新規のYC変異体のCa²⁺応答を示す。表2のBは、YC3.60及びその誘導体の対Ca²⁺親和性を示す。

表 2

Table 2A

	R_{min}	R_{max}	dynamic range (%)	anisotropy	
				-Ca ²⁺	+Ca ²⁺
YC3.12	0.9	1.8	100	0.23	0.17
YC3.20	1.3	1.4	10	0.06	0.10
YC3.30	1.1	2.6	140	0.16	0.07
YC3.60	1.4	9.3	560	0.12	-0.05
YC3.70	1.2	2.4	100	0.15	0.09
YC3.90	1.0	1.7	70	0.17	0.10

Table 2B

	K_d (nM)	fraction (%)		Hill coef
YC2.60	40	—		2.4
YC3.60	250	—		1.7
YC4.60	60	40		1.7
	14000	60		0.9

(2) YC3.60及びYC3.12を発現しているHeLa細胞中のCa²⁺動態の比較測定 (図2)

YC3.12よりもYC3.60が優位であることは、HeLa細胞の細胞質内の遊離Ca²⁺の濃度([Ca²⁺]_s)を観察した実験において、明瞭に実証された。YC3.60又はYC3.12をコードする同量のcDNAをトランスフェクトしたHeLa細胞は、細胞質内区画において明るさの等しい蛍光シグナルを産生した(それぞれ図2A及び2B)。図2C及び2Dは、それぞれYC3.60及びYC3.12を発現しているHeLa細胞由来の空間平均YFP/CFP

比の時間経過を示す。Y C 3. 6 0 は、Y C 3. 1 2 よりも、超極大量の A T P (30 μ M) に対する応答が非常に大きく、Rmin に対する Rmax の比率はほぼ 6 倍大きかった。この比較は、2 種の Y C 間での C a ²⁺ 親和性の差異も示している (Y C 3. 6 0 では K' d = 0. 25 μ M であるのに対し、Y C 3. 1 2 では K' d = 1. 25 μ M)。Y C 3. 6 0 の Rmax 値及び Rmin 値は共に、Y C 3. 1 2 では対応する値において細胞間でのバラつきが見られるのに対して、図 3 A に示した 3 種の細胞及び H e L a 細胞においては、同じ顕微鏡システムで実施した 4 回の他の実験において変化しなかった。(Rmax, 8. 06 \pm 0. 16, n = 12 ; Rmin, 1. 37 \pm 0. 10, n = 12)。

(3) Y C 3. 6 0 を用いた H e L a 細胞中の [C a ²⁺] c および [C a ²⁺] p m の共焦点画像化

Y C 3. 6 0 の大きなダイナミックレンジと明るさは、[C a ²⁺] c 画像化の時間的及び空間的な両方の解像度の実質的な改良を可能にする。Y F P と C F P の画像を迅速かつ同時に得るために、3 個の C C D チップ (R G B : 赤、緑及び青) 及びプリズムで構成されるカラーカメラを用いた。画像化のために、Y F P および C F P 画像は、それぞれ G 及び B チップで捕捉した。また、z 軸に沿う空間解像度を改良するために、カメラの前に回転ディスクユニットを置いた。Y C 3. 6 0 を発現する H e L a 細胞の共焦点の実色画像を図 3 B に示す。蛍光は細胞質内区画に均一に分布したが、ミトコンドリア並びに核からは除外されていた。ビデオ速度で得た一連の疑似色の比率画像 (図 3 A) は、ヒスタミンによる刺激後に、[C a ²⁺] c の増加が個々の細胞内に出現して増加していく様子を示す。増殖速度は、一個の細胞内の 6 列に並んだ関心領域 (R O I) の [C a ²⁺] c の時間経過から 30 μ m / s であると計算された (図 3 B 及び 3 C)。

Y C 3. 6 0 の利点を実証するために、K i - R a s の膜アンカー配列を指示薬の C - 末端に融合させることにより、Y C 3. 6 0 を原形質膜へターゲティングさせた (Y C 3. 6 0_{pm})。同様の膜ターゲティング手法を用いた場合、

従来のYCでは原形質膜下の Ca^{2+} 動態を観察できなかった。YC 3.60 μm の蛍光は周辺構造及び糸状足構造まで分布していた(図3D)。原形質膜下の遊離 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pm}}$)を定量的に測定した(図3E)。ヒスタミンの適用前の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pm}}$ は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ の基礎量より僅かに高かった。これは、顕微鏡では見えない環境中に高 $[\text{Ca}^{2+}]$ のマイクロドメインが存在することを示唆している可能性がある(Marsault, R., 他, (1997)EMBO J. 16, 1575-1581)。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pm}}$ における同様の変化が糸状足構造体においても観察された(図3F)。

産業上の利用可能性

本発明の蛍光指示薬においては、円順列突然変異を施した蛍光蛋白質を用いることにより、エネルギー供与体とエネルギー受容体との相対的位置関係について多様化させることができるようになった。その結果、様々な蛍光指示薬において、ダイナミックレンジを増大することが可能になった。さらに本発明の蛍光指示薬は、細胞又は生体への遺伝子導入により in situ で作製することができるため、大量の可溶性組み換え蛋白質を発現及び精製し、それをインビトロで精製及び標識し、細胞にマイクロインジェクションで戻す必要がない。また、本発明の蛍光指示薬は、細胞構造を標的とすることができる。

請求の範囲

1. 分析物質の標的配列の両端にドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質が結合している構造を有し、分析物質が該標的配列に結合又は作用することにより指示薬の立体構造が変化して蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) が生じる蛍光指示薬において、上記ドナー蛍光蛋白質及び／又は上記アクセプター蛍光蛋白質が、野生型蛍光蛋白質又はその変異体蛋白質のN末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えることにより得られる円順列変異蛍光蛋白質であって、当該円順列変異を施す前の蛍光蛋白質と実質的に同一の蛍光ピーク波長を有する蛍光蛋白質であることを特徴とする蛍光指示薬。
2. 蛍光蛋白質が、GFP、CFP、YFP、RFP、BFP又はそれらの変異体である、請求項1に記載の蛍光指示薬。
3. ドナー蛍光蛋白質がCFP又はその変異体であり、アクセプター蛋白質がYFP又はその変異体である、請求項1又は2に記載の蛍光指示薬。
4. ドナー蛍光蛋白質及び／又は上記アクセプター蛍光蛋白質が、野生型蛍光蛋白質又はその変異体蛋白質のアミノ酸配列中の β ターンに位置するアミノ酸残基においてN末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えることにより得られる、円順列変異蛍光蛋白質である、請求項1から3の何れかに記載の蛍光指示薬。
5. 前記 β ターンに位置するアミノ酸残基が、蛍光蛋白質の蛍光のダイナミックレンジが上昇するような位置のアミノ酸残基である、請求項4に記載の蛍光指示薬。
6. アクセプター蛍光蛋白質が、蛍光蛋白質 Venus の円順列変異体である、請求項1から5の何れかに記載の蛍光指示薬。
7. Venus の円順列変異体が、cp49Venus、cp157Venus、cp173Venus、cp195Venus、又はcp229Venusである、請求項6に記載の蛍光指示薬。

8. 蛍光指示薬がさらに標的ペプチド成分とリンカー成分を含み、分析物質の標的配列が標的ペプチド成分を結合するためのペプチド結合ドメインをさらに含み、

リンカー成分が分析物質の標的配列と標的ペプチド成分とを共有的に結合し、標的配列と標的ペプチド成分がアクセプター蛍光分子成分又はドナー蛍光分子成分の何れかに共有的に結合し、

標的配列に結合した分析物質が標的ペプチド成分及びペプチド結合ドメインの相対的位置又は方向の変化を誘導し、次いでドナー分子及びアクセプター分子成分の相対的位置又は方向に変化が生じ、これにより蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) の効率に変化が生じるが生じる、請求項 1 から 7 の何れかに記載の蛍光指示薬。

9. 標的配列が、カルモジュリン、cGMP 依存性蛋白質キナーゼ、ステロイドホルモン受容体、ステロイドホルモン受容体のリガンド結合ドメイン、蛋白質キナーゼ C、イノシトール-1, 4, 5-トリホスフェート受容体、又はレコベリンである、請求項 1 から 8 の何れかに記載の蛍光指示薬。

10. 標的配列がカルモジュリンである、請求項 9 に記載の蛍光指示薬。

11. 標的ペプチド成分が、骨格筋ミオシン軽鎖キナーゼ (skMLCKp)、平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ (smMLCK)、カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII)、カルデスモン、カルスペルミン、ホスホフルクトキナーゼ、カルシネウリン、ホスホリラーゼキナーゼ、Ca²⁺ATP アーゼ、59 Kda ホスホジエステラーゼ (PDE)、60 Kda ホスホジエステラーゼ (PDE)、ニトリックオキシドシンターゼ、I 型アデニルシクラーゼ、Bordetella pertussis アデニルシクラーゼ、ニューロモジュリン、スペクトリン、ミリストイル化アラニンリッチ C キナーゼ基質 (MARCKS)、MacMARCKS (F52)、b-Adducin、ヒートショック蛋白質 HSP90a、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテイン 160 (HIV-1 gp160)、ブラッシュボーダーミオシン重鎖-I (BBMHBI)、希ミオシン重鎖 (MHC)、マストパラン、メリチン、グルカゴン、セクレチン、血管作動性腸ペプチド (VIP)、ガストリン阻害ペプチド (GIP)、

又はカルモジュリン結合ペプチド-2 (Model ペプチド CBP2) のカルモジュリン結合ドメインである、請求項 8 に記載の蛍光指示薬。

12. リンカー成分が 1 から 30 アミノ酸残基のペプチド成分である、請求項 8 に記載の蛍光指示薬。

13. さらに局在化配列を含む、請求項 1 から 12 の何れかに記載の蛍光指示薬。

14. 局在化配列が核局在化配列、小胞体局在化配列、ペルオキシソーム局在化配列、ミトコンドリア局在化配列、ゴルジ体局在化配列、又は細胞膜局在化配列である、請求項 1 から 13 の何れかに記載の蛍光指示薬。

15. 配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45 又は配列番号 46 の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光指示薬。

16. 試料中の分析物質を検出又は測定する方法であって、
(1) 試料と請求項 1 から 15 の何れかに記載の蛍光指示薬とを接触させる工程；
(2) ドナー成分を励起させる工程；及び
(3) 試料中の分析物質の濃度や活性に対応した試料中の蛍光共鳴エネルギー転移の程度を測定する工程；
を含む方法。

17. 試料が生細胞であり、接触工程が蛍光指示薬を細胞中に取り込ませることを含む、請求項 16 に記載の方法。

18. 細胞へ蛍光指示薬を取り込ませる工程が、蛍光指示薬の発現をコードする核酸配列に作動的に連結した発現調節配列を含む発現ベクターを細胞にトランスフェクションすることを含む、請求項 17 に記載の方法。

19. 請求項 1 から 15 の何れかに記載の蛍光指示薬をコードする核酸。

20. 請求項 19 に記載の核酸を含む発現ベクター。

21. 請求項 19 に記載の核酸又は請求項 20 に記載の発現ベクターを有する形質転換体。

要約書

本発明の目的は、蛍光共鳴エネルギートランスファー（FRET）を利用した分子間相互作用又は分子内構造変化を分析するための新規な蛍光指示薬を提供することである。本発明によれば、分析物質の標的配列の両端にドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質が結合している構造を有し、分析物質が該標的配列に結合又は作用することにより指示薬の立体構造が変化して蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）が生じる蛍光指示薬において、上記ドナー蛍光蛋白質及び／又は上記アクセプター蛍光蛋白質が、野生型蛍光蛋白質又はその変異体蛋白質のN末端側のアミノ酸配列とC末端側のアミノ酸配列を入れ替えることにより得られる円順列変異蛍光蛋白質であって、当該円順列変異を施す前の蛍光蛋白質と実質的に同一の蛍光ピーク波長を有する蛍光蛋白質であることを特徴とする蛍光指示薬が提供される。

図 1

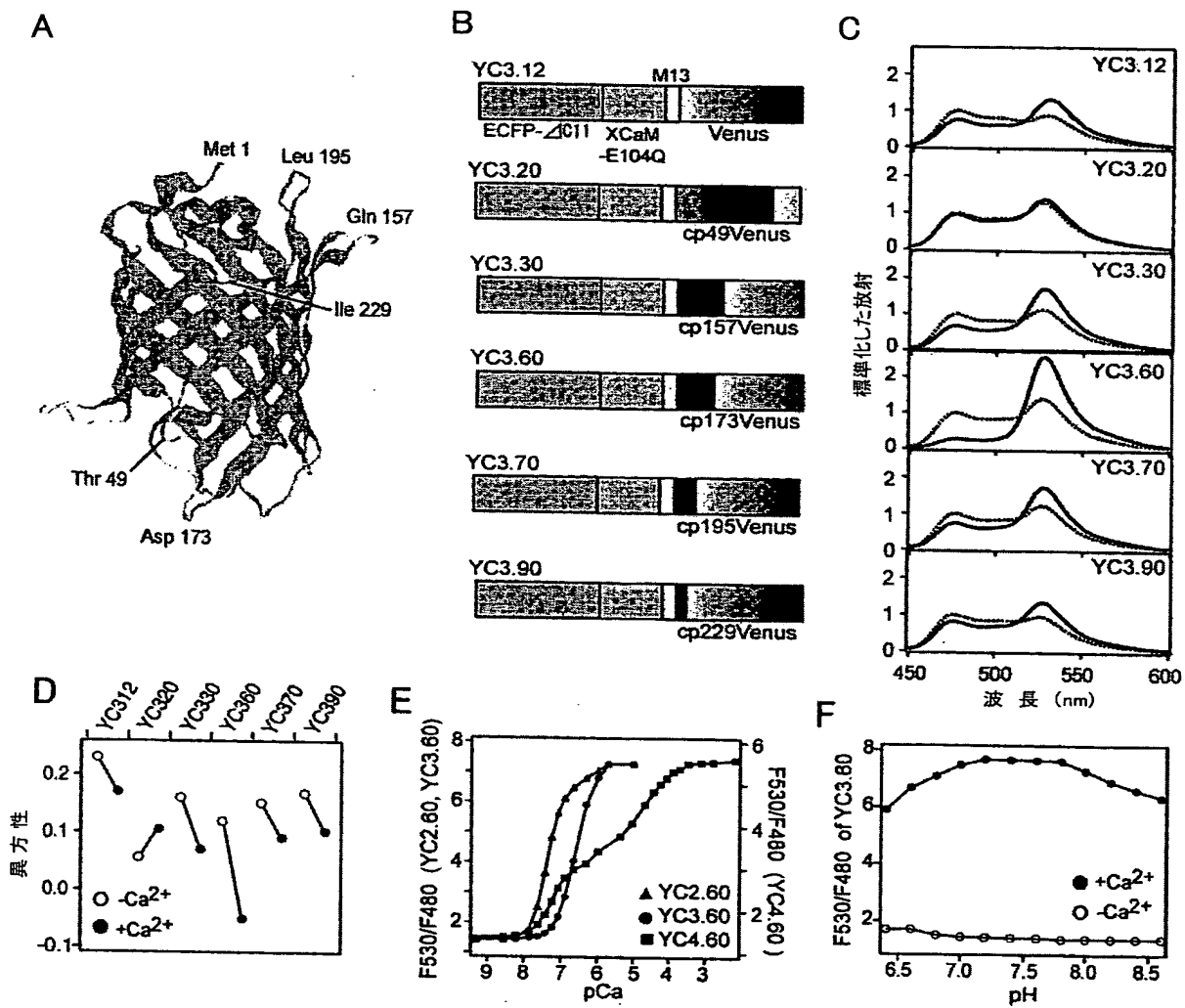


図 2

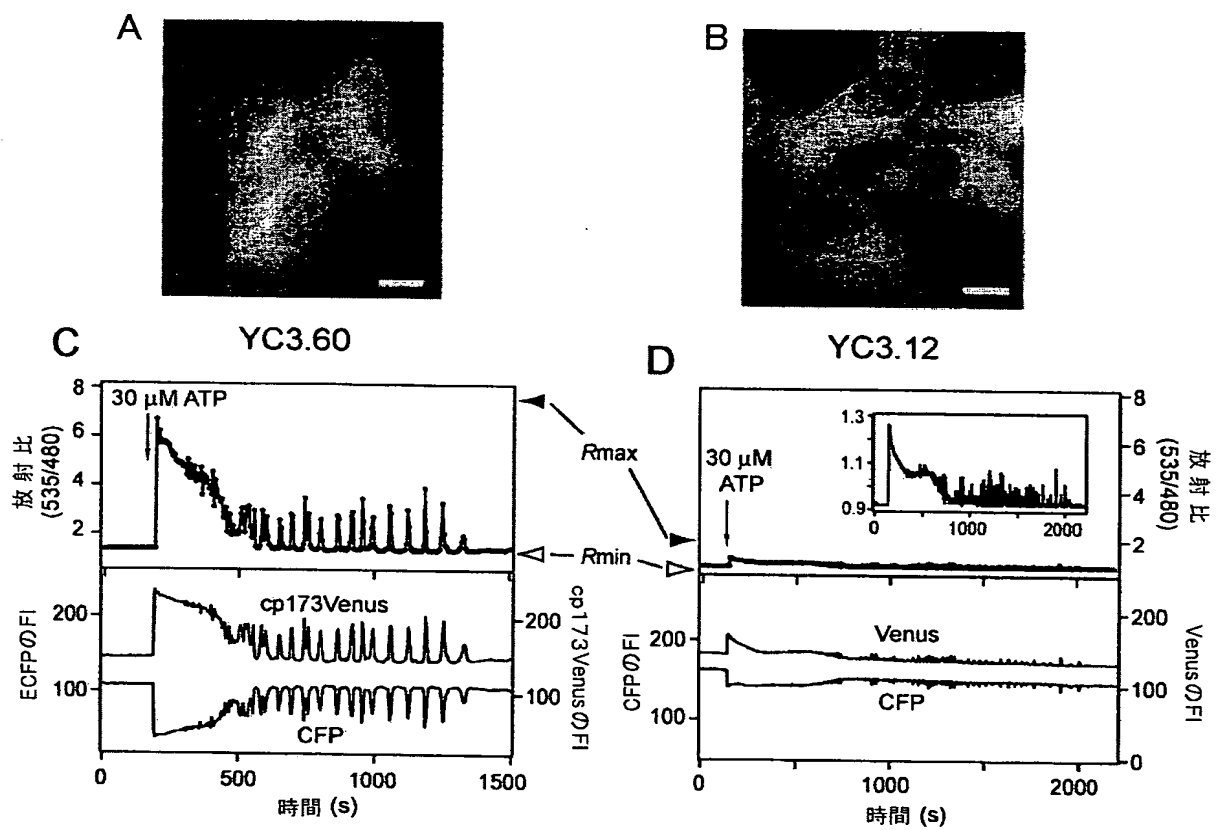
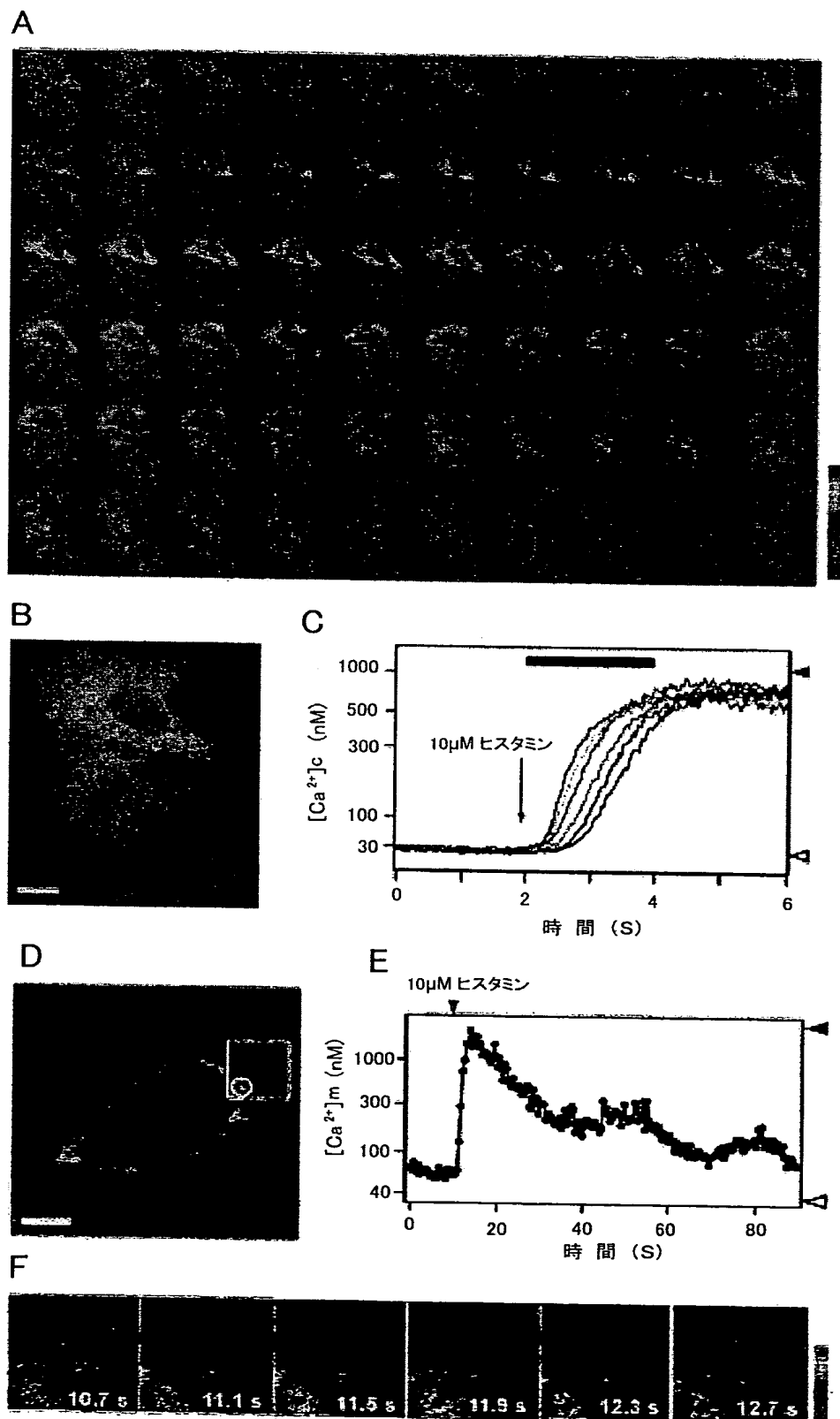


図 3



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY

<120> A fluorescent indicator using FRET

<130> A41654A

<160> 46

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> animal

<400> 1

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg

1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu

20 25

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> animal

<400> 2

Ala Arg Arg Lys Trp Gln Lys Thr Gly His Ala Val Arg Ala Ile Gly

1 5 10 15

Arg Leu Ser Ser

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> animal

<400> 3

Ala Arg Arg Lys Leu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Thr Met Leu Ala Thr

1 5 10 15

Arg Asn Phe Ser

20

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> animal

<400> 4

Gly Val Arg Asn Ile Lys Ser Met Trp Glu Lys Gly Asn Val Phe Ser

1 5 10 15

Ser

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> animal

<400> 5

Ala Arg Arg Lys Leu Lys Ala Ala Val Lys Ala Val Val Ala Ser Ser

1 5 10 15

Arg Leu Gly Ser

20

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> animal

<400> 6

Phe Met Asn Asn Trp Glu Val Tyr Lys Leu Leu Ala His Ile Arg Pro

1 5 10 15

Pro Ala Pro Lys Ser Gly Ser Tyr Thr Val

20 25

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> animal

<400> 7

Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile Arg Ala Ile Gly Lys Met

1 5 10 15

Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg

20

<210> 8

<211> 26

<212> PRT

<213> animal

<400> 8

Leu Arg Arg Leu Ile Asp Ala Tyr Ala Phe Arg Ile Tyr Gly His Trp

1 5 10 15

Val Lys Lys Gly Gln Gln Gln Asn Arg Gly

20 25

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> animal

<400> 9

Arg Gly Lys Phe Lys Val Ile Cys Leu Thr Val Leu Ala Ser Val Arg

1 5 10 15

Ile Tyr Tyr Gln Tyr Arg Arg Val Lys Pro Gly

20 25

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> animal

<400> 10

Leu Arg Arg Gly Gln Ile Leu Trp Phe Arg Gly Leu Asn Arg Ile Gln

1 5 10 15

Thr Gln Ile Lys Val Val Asn Ala Phe Ser Ser Ser

20 25

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> animal

<400> 11

Arg Arg Lys His Leu Gln Arg Pro Ile Phe Arg Leu Arg Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Gln Leu Glu Lys

20

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> animal

<400> 12

Thr Glu Lys Met Trp Gln Arg Leu Lys Gly Ile Leu Arg Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Gln Leu Glu Lys

20

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> animal

<400> 13

Lys Arg Arg Ala Ile Gly Phe Lys Lys Leu Ala Glu Ala Val Lys Phe

1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Met Gly Gln

20

<210> 14

<211> 28

<212> PRT

<213> animal

<400> 14

Ile Lys Pro Ala Lys Arg Met Lys Phe Lys Thr Val Cys Tyr Leu Leu

1 5 10 15

Val Gln Leu Met His Cys Arg Lys Met Phe Lys Ala

20

25

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> animal

<400> 15

Ala Cys Ile Asp Leu Leu Trp Lys Ile Ala Arg Ala Gly Ala Arg Ser

1 5 10 15

Ala Val Gly Thr Glu Ala

20

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> animal

<400> 16

Lys Ala His Lys Ala Ala Thr Lys Ile Gln Ala Ser Phe Arg Gly His

1 5 10 15

Ile Thr Arg Lys Lys Leu Lys Gly Glu Lys Lys

20 25

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> animal

<400> 17

Lys Thr Ala Ser Pro Trp Lys Ser Ala Arg Leu Met Val His Thr Val

1 5 10 15

Ala Thr Phe Asn Ser Ile Lys Glu

20

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> animal

<400> 18

Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser

1 5 10 15

Gly Phe Ser Phe Lys Lys Ser Lys Lys

20 25

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> animal

<400> 19

Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly

1 5 10 15

Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys

20

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> animal

<400> 20

Lys Gln Gln Lys Glu Lys Thr Arg Trp Leu Asn Thr Pro Asn Thr Tyr

1 5 10 15

Leu Arg Val Asn Val Ala Asp Glu Val Gln Arg Asn Met Gly Ser

20 25 30

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> animal

<400> 21

Lys Asp Gln Val Ala Asn Ser Ala Phe Gln Glu Arg Leu Arg Lys His

1

5

10

15

Gly Leu Glu Val Ile

20

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> animal

<400> 22

Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Lys Arg Ile Val Glu

1

5

10

15

Leu Leu Gly Arg Arg

20

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> animal

<400> 23

Gln Gln Leu Ala Thr Leu Ile Gln Lys Thr Tyr Arg Gly Trp Arg Cys

1

5

10

15

Arg Thr His Tyr Gln Leu Met

20

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

<213> animal

<400> 24

Arg Ala Ala Cys Ile Arg Ile Gln Lys Thr Ile Arg Gly Trp Leu Leu

1

5

10

15

Arg Lys Arg Tyr Leu Cys Met Gln

20

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> animal

<400> 25

Ile Asn Leu Lys Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

1

5

10

<210> 26

<211> 26

<212> PRT

<213> animal

<400> 26

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu

1

5

10

15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

20

25

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> animal

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp

1	5	10	15
Ser	Arg	Arg	Ala
Gln	Asp	Phe	Val
Gln	Trp	Leu	Met
Asn	Thr		
20	25	30	

<210> 28

<211> 27

<212> PRT

<213> animal

<400> 28

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Glu Leu Ser Arg Leu Arg Asp Ser

1	5	10	15
Ala	Arg	Leu	Gln
Arg	Leu	Leu	Gln
Gly	Leu	Val	
20	25		

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

<213> animal

<400> 29

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1	5	10	15
Met	Ala	Val	Lys
Lys	Lys	Tyr	Leu
Asn	Ser	Ile	Leu
Asn			
20	25		

<210> 30

<211> 33

<212> PRT

<213> animal

<400> 20

Tyr Ala Asp Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ala Ile Met Asn Lys

1 5 10 15

Ile Arg Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Gln Gln Lys

20 25 30

Ser

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> animal

<400> 31

Lys Leu Trp Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<400> 32

Lys Lys Lys Arg Lys

5

<210> 33

<211> 26

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<400> 33

Met Leu Arg Thr Ser Ser Leu Phe Thr Arg Arg Val Gln Pro Ser Leu

1

5

10

15

Phe Arg Asn Ile Leu Arg Leu Gln Ser Thr

20

25

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<400> 34

Lys Asp Glu Leu

<210> 35

<211> 3

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<400> 35

Ser Lys Leu

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<220>

<222> (4)

<223> any amino acid

<400> 36

Cys Ala Ala Xaa

<210> 37

<211> 2

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<400> 37

Cys Cys

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<220>

<222> (2)

<223> any amino acid

<400> 38

Cys Xaa Cys

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<220>

<222> (3), (4)

<223> any amino acid

<400> 39

Cys Cys Xaa Xaa

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 40

Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr
1 5 10 15

<210> 41

<211> 647

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 41

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60
Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100	105	110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu	Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly	
115	120	125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
130	135	140
Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn		
145	150	155
Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser		160
165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly		
180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu		
195	200	205
Ser Lys Asp Pro Lys Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe		
210	215	220
Val Thr Ala Ala Arg Met His Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala		
225	230	235
Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr		240
245	250	255
Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn		
260	265	270
Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp		
275	280	285
Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg		
290	295	300
Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg		
305	310	315
		320

Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu Arg			
	325	330	335
His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp			
	340	345	350
Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr			
	355	360	365
Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Lys Arg Arg Trp			
	370	375	380
Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys Lys Ile			
	385	390	400
Ser Ser Ser Gly Ala Leu Glu Leu Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu			
	405	410	415
Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn			
	420	425	430
Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr			
	435	440	445
Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val			
	450	455	460
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe			
	465	470	480
Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala			
	485	490	495
Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp			
	500	505	510
Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu			
	515	520	525
Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn			

530	535	540	
Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr			
545	550	555	560
Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile			
	565	570	575
Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln			
	580	585	590
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His			
	595	600	605
Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg			
	610	615	620
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu			
625	630	635	640
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			

645

<210> 42

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 42

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu			
1	5	10	15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly			
	20	25	30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile			
	35	40	45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr			

50	55	60
Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys		
65	70	75
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu		80
85	90	95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu		
100	105	110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly		
115	120	125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
130	135	140
Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn		
145	150	155
Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser		160
165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly		
180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu		
195	200	205
Ser Lys Asp Pro Lys Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe		
210	215	220
Val Thr Ala Ala Arg Met His Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala		
225	230	235
Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr		240
245	250	255
Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn		
260	265	270

Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp			
275	280	285	
Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg			
290	295	300	
Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg			
305	310	315	320
Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu Arg			
325	330	335	
His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp			
340	345	350	
Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr			
355	360	365	
Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Lys Arg Arg Trp			
370	375	380	
Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys Lys Ile			
385	390	395	400
Ser Ser Ser Gly Ala Leu Glu Leu Met Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro			
405	410	415	
Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala			
420	425	430	
Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met			
435	440	445	
Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly			
450	455	460	
Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val			
465	470	475	480
Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile			

	485		490		495
Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile					
	500		505		510
Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg					
	515		520		525
His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln					
	530		535		540
Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr					
545		550		550	560
Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp					
	565		570		575
His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly					
	580		585		590
Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly					
	595		600		605
Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly					
	610		615		620
Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp					
625		630		635	640
Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr					
	645		650		

<210> 43

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 43

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1	5	10	15												
Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Arg	Phe	Ser	Val	Ser	Gly
	20		25		30										
Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile
	35		40		45										
Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr
	50		55		60										
Leu	Thr	Trp	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys
	65		70		75									80	
Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu
		85			90									95	
Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
	100				105									110	
Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
	115				120									125	
Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
	130				135									140	
Asn	Tyr	Ile	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
	145				150									155	160
Gly	Ile	Lys	Ala	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser
		165												170	175
Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly
	180													185	190
Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu
	195													200	205
Ser	Lys	Asp	Pro	Lys	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
	210													215	220

Val Thr Ala Ala Arg Met His Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala			
225	230	235	240
Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr			
	245	250	255
Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn			
	260	265	270
Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp			
	275	280	285
Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg			
	290	295	300
Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg			
305	310	315	320
Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu Arg			
	325	330	335
His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp			
	340	345	350
Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr			
	355	360	365
Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Lys Arg Arg Trp			
	370	375	380
Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys Lys Ile			
385	390	395	400
Ser Ser Ser Gly Ala Leu Glu Leu Met Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala			
	405	410	415
Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala			
	420	425	430
Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu			

435	440	445
Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro		
450	455	460
Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala		
465	470	475
Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly		
485	490	495
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu		
500	505	510
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly		
515	520	525
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile		
530	535	540
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr		
545	550	555
Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys		
565	570	575
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu		
580	585	590
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu		
595	600	605
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly		
610	615	620
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
625	630	635
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys		
645	650	

<210> 44

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 44

Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu
1				5					10					15	
Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Arg	Phe	Ser	Val	Ser	Gly
			20					25					30		
Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile
			35					40					45		
Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr
		50				55					60				
Leu	Thr	Trp	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys
		65				70				75				80	
Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu
				85						90				95	
Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
			100						105					110	
Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
			115						120					125	
Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
			130					135					140		
Asn	Tyr	Ile	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
			145				150				155			160	
Gly	Ile	Lys	Ala	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser
				165						170				175	

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
180	185	190	
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
195	200	205	
Ser Lys Asp Pro Lys Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
210	215	220	
Val Thr Ala Ala Arg Met His Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala			
225	230	235	240
Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr			
245	250	255	
Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn			
260	265	270	
Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp			
275	280	285	
Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg			
290	295	300	
Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg			
305	310	315	320
Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu Arg			
325	330	335	
His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp			
340	345	350	
Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr			
355	360	365	
Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Lys Arg Arg Trp			
370	375	380	
Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys Lys Ile			

385	390	395	400
Ser Ser Ser Gly Ala Leu Glu Leu Met Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala			
	405	410	415
Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu			
	420	425	430
Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro			
	435	440	445
Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala			
	450	455	460
Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly			
465	470	475	480
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu			
	485	490	495
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly			
	500	505	510
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile			
	515	520	525
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr			
	530	535	540
Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys			
545	550	555	560
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu			
	565	570	575
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu			
	580	585	590
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly			
	595	600	605

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
610 615 620

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
625 630 635 640

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
645 650

<210> 45

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 45

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr			
130	135	140	
Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn			
145	150	155	160
Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
165	170	175	
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
180	185	190	
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
195	200	205	
Ser Lys Asp Pro Lys Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
210	215	220	
Val Thr Ala Ala Arg Met His Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala			
225	230	235	240
Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr			
245	250	255	
Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn			
260	265	270	
Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp			
275	280	285	
Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg			
290	295	300	
Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg			
305	310	315	320
Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu Arg			
325	330	335	
His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp			

340	345	350
Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr		
355	360	365
Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Lys Arg Arg Trp		
370	375	380
Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys Lys Ile		
385	390	395
Ser Ser Ser Gly Ala Leu Glu Leu Met Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu		
405	410	415
Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His		
420	425	430
Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met		
435	440	445
Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu		
450	455	460
Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp		
465	470	475
Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala		
485	490	495
Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu		
500	505	510
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln		
515	520	525
Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys		
530	535	540
Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys		
545	550	555
		560

Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
 565 570 575
 Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp
 580 585 590
 Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn
 595 600 605
 Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe
 610 615 620
 Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His
 625 630 635 640
 Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu
 645 650

<210> 46

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 46

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu			
	85	90	95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu			
	100	105	110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly			
	115	120	125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr			
	130	135	140
Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn			
	145	150	155
Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
	165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
	180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
	195	200	205
Ser Lys Asp Pro Lys Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
	210	215	220
Val Thr Ala Ala Arg Met His Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala			
	225	230	235
Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr			
	245	250	255
Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn			
	260	265	270
Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp			
	275	280	285
Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg			

290	295	300
Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg		
305	310	315
Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu Arg		320
	325	330
		335
His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp		
	340	345
		350
Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr		
	355	360
		365
Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Lys Arg Arg Trp		
	370	375
		380
Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys Lys Ile		
385	390	395
		400
Ser Ser Ser Gly Ala Leu Glu Leu Met Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu		
	405	410
		415
Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu		
	420	425
		430
Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn		
	435	440
		445
Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr		
	450	455
		460
Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val		
465	470	475
		480
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe		
	485	490
		495
Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala		
	500	505
		510

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.